

538277  
Rec'd PCT 10 JUN 2005

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

10/538277

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
1 de Julio de 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/054600 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: A61K 35/78,  
A61P 1/18

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/MX2003/000108

(22) Fecha de presentación internacional:  
11 de Diciembre de 2003 (11.12.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
PA/a/2002/012315  
13 de Diciembre de 2002 (13.12.2002) MX

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
[MX/MX]; Prolongación Canal de Miramontes 3855,  
Colonia Ex-Hacienda de San Juan de Dios, México, D.F.,  
C.P. 14387 (MX).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): SOTO  
PEREDO, Claudia, Angélica [MX/MX]; Manzana 6,  
Grupo 1, Casa 2, Colonia Unidad Santa Fe, México, D.F.,  
C.P. 01170 (MX).

(74) Mandatario: PÉREZ SALAZAR, Sara; Prolongación  
Canal de Miramontes 3855, Colonia Ex-Hacienda de San  
Juan de Dios, México, D.F., C.P. 14387 (MX).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declaración según la Regla 4.17:**

— sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) sólo para US

**Publicada:**

— con informe de búsqueda internacional  
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-  
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-  
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOUND CONTAINING SILYMARIN AND CARBOPOL<sup>®</sup>, PRODUCTION METHOD  
THEREOF AND USE OF SAME AS A REGENERATOR OF TISSUE AND PANCREATIC CELLS WITH ENDOGENOUS SE-  
CRETION DAMAGED BY DIABETES MELLITUS

(54) Título: COMPUESTO FARMACÉUTICO QUE CONTIENE SILIMARINA Y CARBOPOL, SU PROCESO DE FABRI-  
CACIÓN Y SU USO COMO REGENERADOR DEL TEJIDO Y CÉLULAS PANCREÁTICAS DE SECRECIÓN ENDÓGENA  
DAÑADOS POR DIABETES MELLITUS

(57) Abstract: The invention relates to a novel compound containing silymarin and Carbopol<sup>®</sup> for the treatment of diabetes mellitus.  
The inventive compound morphologically and structurally regenerates the damaged part of the pancreatic tissue in diabetes mellitus  
and regenerates the insulin-producing pancreatic cells ( $\beta$  cells). In this way, the compound regulates the serum levels of said hormone.  
Moreover, the compound restores and maintains normal blood glucose levels concentrations.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un nuevo compuesto que contiene Silimarina con Carbopol para el tratamiento de  
la Diabetes Mellitus. Este compuesto regenera morfológica y estructuralmente el daño que se presenta en el tejido pancreático en  
la Diabetes Mellitus, regenera las células pancreáticas productoras de insulina (células  $\beta$ ). Por lo tanto regula los niveles séricos de  
esta hormona. Así mismo, restaura y mantiene las concentraciones normales de la glucosa sanguínea.

WO 2004/054600 A1

**COMPUESTO FARMACÉUTICO QUE CONTIENE SILIMARINA Y  
CARBOPOL, SU PROCESO DE FABRICACIÓN Y SU USO COMO  
REGENERADOR DEL TEJIDO Y CÉLULAS PANCREÁTICAS DE  
SECRECIÓN ENDÓGENA DAÑADOS POR DIABETES MELLITUS**

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5

Actualmente, en el tratamiento farmacológico de la Diabetes Mellitus, se utilizan la insulina y grupos de fármacos hipoglucemiantes como las Sulfonilureas, las Biguanidas, inhibidores de la  $\alpha$ -glucocidasa y derivados de la Tiazolidinediona, cuyo mecanismo de acción se lleva a cabo ya sea  
10 estimulando la secreción de insulina o bien aumentando la acción de esta hormona sobre los tejidos corporales. La vida media de estos fármacos varía de 1.5 a 48 horas. Aunque todos estos fármacos, por diferentes mecanismos de acción regulan la concentración de glucosa sanguínea y/o la secreción de  
15 de ellos lleva a cabo la regeneración de las células  $\beta$ -pancreáticas que producen la insulina y que permitan restaurar la función de esta hormona. Por otro lado, tanto la insulina exógena como los fármacos hipoglucemiantes pueden causar efectos colaterales como: hipoglucemia, diarrea, malestares abdominales, náusea y anorexia (Davis, S. y Granner, D. Insulina, Fármacos  
20 hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endógeno. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Eds.: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman, R., 8a. Ed. pags. 1581-1614, 1996).

Ninguno de los medicamentos que se utilizan actualmente para el tratamiento  
25 de la Diabetes Mellitus regenera tejidos ni células de secreción endógena dañadas entre las que se encuentran las  $\beta$ -pancreáticas como lo hace el compuesto de Silimarina y Carbopol.

Tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado que la Silimarina tiene actividad protectora y regenerativa sobre las células hepáticas contra el daño producido  
30 por diferentes sustancias tóxicas como: faloidina,  $\alpha$ -amanitina, alcohol, galactosamina, metales pesados, tetracloruro de carbono, tolueno, xileno, o

por algunos fármacos como: acetaminofén, indometacina, isoniazida y tolbutamida (Wellington, K., Harvis, B., Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. Biodrugs. 15: 465-489, 2001) ya que se ha demostrado que estabiliza a la membrana celular y la

5 protege contra los radicales libres, es decir, que tiene propiedades antioxidativas por producir un aumento en el contenido de glutatión (captador de radicales libres) hepático (Valenzuela, A., Garrido, A. Biochemical basis of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biol. Res. 27:105-112, 1994).

10 En el humano la Silimarina se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades hepáticas como la cirrosis, el envenenamiento por el hongo *Amanita phalloides* y en la exposición a sustancias tóxicas (Wellington, K., Harvis, B., Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. Biodrugs. 15: 465-489, 2001).

15 Se ha sugerido que los radicales libres participan de manera importante en la etiología de la Diabetes Mellitus ya que se han encontrado niveles séricos elevados de malondialdehído (producto final de la lipoperoxidación) en pacientes con esta enfermedad (Paolisso G, De Amore, A, Di Maro G, D' Onofrio F: Evidence for a relationship between free radicals and insulin action

20 in the elderly. Metabolism, 42:659-66, 1993). Dichos niveles de malondialdehído están en relación directa con el grado de complicaciones presentes en los pacientes con Diabetes Mellitus. Entre los mecanismos de defensa contra los radicales libres se encuentran el glutatión y enzimas antioxidantes como la supeóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la

25 catalasa. Soto y col. (Soto C, Pérez B, Favari L, Reyes J: Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. Comp. Biochem. Physiol. 119C:125-129, 1998) reportaron que la Silimarina aumenta el contenido de glutatión pancreático, hepático y por lo tanto su nivel en sangre. Los autores del trabajo anteriormente citado también encontraron que la Silimarina impidió la

30 elevación de radicales libres en el páncreas durante la inducción de la Diabetes Mellitus, lo que tuvo como consecuencia la disminución de la glucosa sanguínea la cual se encuentra elevada en esta enfermedad.

Tomando en consideración los antecedentes descritos se utilizó al compuesto de Silimarina y Carbopol como agente antidiabético el cual se pretende

35 proteger por medio de la presente solicitud ya que presentó un efecto

tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol (cuando los niveles de glucosa se encontraron en el rango de los valores normales).

Los resultados mostraron que en la Diabetes Mellitus (tratamiento con Aloxana en forma única) hay una disminución del 80 al 90% en los niveles séricos de insulina con respecto al valor normal que es de 1 ng/ml. Se observó que el  
5 tratamiento conjunto del compuesto de Silimarina y Carbopol y Aloxana impidió la disminución de los niveles séricos de insulina y los mantuvo dentro del rango del valor normal. En el caso del tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol 20 días posteriores a la administración de la Aloxana, se observó el  
10 nivel sérico de la insulina aumentó hasta el rango de los valores normales. Estos valores normales de insulina sérica correspondieron con los de glucosa (ejemplo 1).

### Ejemplo 3:

15

#### **Análisis histopatológico del tejido pancreático**

Este análisis se realizó en fragmentos transversales de páncreas de aproximadamente 0.7 cm de largo correspondientes a la cabeza del órgano. Posteriormente, mediante la técnica de inclusión en parafina se procedió a la  
20 obtención de los cortes de 5 µm los cuales se tiñeron con los colorantes hematoxilina y eosina (HE). Esta técnica consiste en: 1) deshidratación del tejido, la cual se realiza mediante el paso del tejido por diversas concentraciones de alcohol (de 25 hasta 100%) y posteriormente a una mezcla alcohol-tolueno, tolueno-parafina y parafina. Una vez deshidratados los tejidos  
25 se hacen bloques con parafina. 2) Corte del tejido. Este se realiza en un microtomo el cual se ajusta para el grosor adecuado de corte de 4 a 6 µm y se colocan en portaobjetos. 3) Tinción de los cortes. Esta se realizó mediante con los colorantes hematoxilina y eosina.

En el caso de la administración conjunta del compuesto de Silimarina y  
30 Carbopol y Aloxana, el análisis histopatológico se realizó a los 3, 5, 15 y 30 días posteriores del tratamiento. Para el caso en el que se inició el tratamiento del compuesto de Silimarina y Carbopol 20 días posteriores a la administración de la Aloxana, el análisis histopatológico se realizó 20 días después la aplicación de la Aloxana y al término del tratamiento con el compuesto de

- agente diabetogénico, Aloxana, impidió el aumento en la concentración de glucosa sérica que se presentó con la administración de Aloxana en forma única. Los resultados obtenidos del tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol iniciado veinte días posteriores a la administración de la Aloxana
- 5 mostraron que los valores de la concentración de glucosa sérica que se encontraban significativamente elevados, aproximadamente en un 400% sobre el valor normal (antes de iniciar el tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol) fueron disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar los niveles normales en un tiempo promedio de siete semanas.
- 10 El tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol administrado en forma única no modificó la concentración de glucosa sérica.

## **Ejemplo 2**

- Determinación de la concentración de insulina en sangre por el método**
- 15 **de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).**

- Esta determinación se llevó a cabo en 10 µl de suero, el cual se incubó durante dos horas con dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos separados en la molécula de insulina. Durante la incubación, la
- 20 insulina de la muestra reaccionó con anticuerpos antiinsulina y con anticuerpos antiinsulina conjugados con peroxidasa. Después de este tiempo se hizo un lavado para eliminar al anticuerpo que no se unió a las moléculas de insulina de la muestra. Posteriormente se agregaron 200 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y las muestras permanecen con este reactivo durante 30
- 25 minutos para poder detectar el compuesto conjugado que es colorido y se puede cuantificar espectrofotométricamente. La reacción se finalizó mediante la adición 50 µl de ácido sulfúrico y se leyó a 450 nm en un lector de ELISA para poder determinar la concentración de insulina en cada una de las muestras.
- En el caso de la administración conjunta del compuesto de Silimarina y
- 30 Carbopol y Aloxana, la determinación de insulina sérica se realizó antes de la administración de los fármacos y a los 3, 5, 15 y 30 días posteriores al tratamiento. Para el caso en el que se inició el tratamiento del compuesto de Silimarina y Carbopol 20 días posteriores a la administración de la Aloxana, la determinación de la insulina sérica se realizó previamente a la administración
- 35 de algún fármaco, 20 días después la aplicación de la Aloxana y al término del

subcutánea una hora después de la primera dosis del compuesto de Silimarina y Carbopol.

Otro ejemplo que se utilizó también para demostrar el efecto regenerador pancreático del compuesto de Silimarina y Carbopol es en el que se probó el efecto de este compuesto de manera separada con el agente diabetogénico, es decir, primero se administró la Aloxana y después de 20 días se inició el tratamiento diario con el compuesto de Silimarina y Carbopol a las mismas dosis ya mencionadas en los dos casos anteriores por un período de tiempo de 4<sup>a</sup> a 7 semanas.

La demostración del efecto antidiabético de este compuesto de Silimarina y Carbopol se describe en los ejemplos que se citan a continuación.

### Ejemplo 1

15

#### Determinación de glucosa sérica

La determinación de glucosa en sangre se llevó a cabo por el método de Baner. Este consistió en tomar 50 µl de suero a los cuales se les adicionaron 3.0 ml de reactivo de orto-toluidina que reacciona con aldohexosas y forma glicosamina y una base de Schiff, el color verde desarrollado tiene una absorción máxima a 620 nm y es proporcional a la cantidad de glucosa presente.

En el caso de la administración conjunta del compuesto de Silimarina y Carbopol con Aloxana se realizó la determinación de glucosa sérica antes de la administración de los fármacos y a los 3, 5, 15 y 30 días posteriores al tratamiento. Para el caso en el que se inició el tratamiento del compuesto de Silimarina y Carbopol 20 días posteriores a la administración de la Aloxana, la determinación de la glucosa sérica se realizó previamente a la administración de algún fármaco, 20 días después la aplicación de la Aloxana y posteriormente cada semana después de que se inició el tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol.

Los resultados mostraron que en la Diabetes Mellitus (tratamiento con Aloxana en forma única) hubo un aumento del 100 al 400% en los niveles séricos de la glucosa con respecto a los valores normales que van de 80 a 120 mg/dl. El compuesto de Silimarina y Carbopol administrado en forma conjunta con el

desconocido como regenerador pancreático y controlador de la concentración sérica de la glucosa, la cual no está regulada en los pacientes diabéticos.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

La presente invención corresponde al uso de Silimarina con Carbopol como regenerador del tejido y células pancreáticas de secreción endógena dañadas por Diabetes Mellitus, el cual suprime los efectos colaterales e inconvenientes que se presentan con la administración de fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de la Diabetes Mellitus.

10

El compuesto de Silimarina y Carbopol se obtiene a partir de los siguientes pasos:

a) Disolución al 0.5 % de Carbopol en agua desionizada en un agitador magnético durante una hora.

15

b) Adición de Silimarina en un porcentaje de 5 a la disolución anterior y se somete a agitación por un período mínimo de una hora hasta lograr una mezcla homogénea.

20

La mezcla homogénea se podrá presentar con cualquier vehículo en formulaciones para administración oral como son: solución, suspensión, emulsión, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de gelatina blanda, tabletas de liberación inmediata, tabletas de liberación sostenida, tabletas de liberación prolongada, tabletas de liberación controlada.

25

Un ejemplo ilustrativo pero no limitativo para demostrar la actividad regeneradora pancreática del compuesto de Silimarina y Carbopol es en el que este se administró por vía oral a una dosis de 200 mg/Kg ya sea en forma simultánea con el agente diabetogénico Aloxana o de manera separada.

30

El tratamiento conjunto del compuesto de Silimarina y Carbopol con la Aloxana se realizó de dos modos. En el primero se administró oralmente una dosis de 200 mg/Kg del compuesto de Silimarina y Carbopol a las 6, 24 y 48 horas (dos días) posteriores a una primera dosis. En el segundo, además de las dosis mencionadas en el primer modo, se prolongó la administración cada 24 horas después de la última dosis durante cinco días más (siete días). En ambos casos, la dosis de Aloxana fue de 150 mg/Kg que se administró por vía

Silimarina y Carbopol (cuando los niveles de glucosa se encontraron en el rango de los valores normales, es decir de 80 a 120 mg/dl).

En la Diabetes Mellitus (tratamiento con Aloxana en forma única) se presentó daño en el tejido pancreático que se observó como una desorganización celular con pérdida de los islotes de Langherhans. Se observaron también zonas de necrosis, de lisis celular, hemorrágicas, de infiltración de linfocitos, lisis de eritrocitos así como un aumento en el tejido adiposo que forma la cápsula del lobulillo.

El tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol administrado en forma conjunta con la Aloxana, impidió el daño tisular en el páncreas que se presentó en la Diabetes Mellitus, es decir, que el tejido no presentó ninguna alteración. La administración del compuesto de Silimarina y Carbopol, 20 días posteriores a la administración de la Aloxana regeneró el tejido pancreático, es decir, que todo el daño observado en la Diabetes Mellitus fue revertido totalmente y se observó un tejido completamente normal.

#### **Ejemplo 4**

##### **Análisis inmunohistoquímico para insulina y glucágon en los islotes de Langherhans por microscopía confocal**

Este análisis se lleva a cabo en cortes de tejido pancreático (correspondientes a la cabeza del páncreas). Una vez obtenidos los cortes (descrito en el ejemplo 3) se colocan sobre portaobjetos y se procede a desparafinar y rehidratar el tejido. Se inicia en xilol puro, con dos cambios de 10 minutos cada uno. Posteriormente las muestras se pasan a una mezcla de etanol-xilol por 10 minutos y después a alcoholes de diferentes porcentajes: 100, 90, 80 y 70% durante cinco minutos en cada uno. Finalmente se pasan a una solución de PBS (solución amortiguada de fosfatos) durante 30 minutos para llevar a cabo posteriormente el proceso de inmunotinción. Esta se inicia con la incubación de las muestras en una solución de PBS-Tritón por 10 minutos a temperatura ambiente (20-22°C), se lavan con PBS sin tritón, y se bloquean las muestras con albúmina en PBS. Se lavan las muestras con PBS de 1 a 5 minutos. Posteriormente se hace una mezcla de anticuerpos primarios antiinsulina y antiglucágon en PBS y se dejan incubar aproximadamente 12 horas. Al cabo de este tiempo se lavan con PBS y se incuban en una mezcla de anticuerpos



secundarios acoplados a fluorocromos, fluoresceína y rodamina, durante una hora a temperatura ambiente y se montan en un medio específico para preservar la fluorescencia. Las muestras se analizan por microscopía confocal. En la Diabetes Mellitus (tratamiento con Aloxana en forma única) (figura 1) se

5 presentó una destrucción del islote pancreático y se observaron solamente algunos fragmentos de este con una presencia muy escasa de insulina ( $\beta$ ) y glucágon ( $\alpha$ ). En el tratamiento con el compuesto de Silimarina y Carbopol administrado en forma conjunta con la Aloxana (figura 2), se impidió la

10 destrucción del islote pancreático y este presentó una imagen muy semejante a la de un islote en condiciones normales, es decir, que todas las células que lo conforman se mostraron conservadas. En la mayor parte de estas está presente la insulina ( $\beta$ ), producto de las células  $\beta$  y solamente en las de la periferia se observó el glucágon ( $\alpha$ ) producto de las células  $\alpha$ .

La administración del compuesto de Silimarina y Carbopol veinte días

15 posteriores a la Aloxana revirtió el daño observado en la Diabetes Mellitus, es decir, produjo la regeneración del islote pancreático destruido observándose un islote con las características normales (descritas en el párrafo anterior) lo que implica la recuperación del funcionamiento de las células  $\beta$ -pancreáticas y por lo tanto la producción de insulina.

20 Esta metodología es equivalente para aplicarla en ser humano en cualquier tipo de Diabetes ya que el nivel de acción de esta composición es a nivel de la disfunción o destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas y sus mecanismos contra el daño celular por radicales libres.

## 25 Ejemplo 5:

### **Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes pancreáticas**

Se determinó la actividad pancreática de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Para realizar tal determinación se

30 pesó el páncreas, se homogenizó con amortiguador de fosfatos 50mM, se centrifugó a 3000 rpm, se separó el sobrenadante. La actividad de las enzimas mencionadas se determinó en este.

Superóxido dismutasa.- Esta cuantificación se llevó a cabo por el método de Prasad y col. (1992). Mediante xantina y xantina oxidasa se forman iones

35 superóxido. Estos iones reaccionan con el azul de tetrazolio y forman un

compuesto colorido que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 560nm. Una unidad de superóxido dismutasa puede inhibir la formación de este compuesto en un 50%.

- 5 Glutación peroxidasa.- Esta cuantificación se realizó por el método de Prasad y col. (1992). Esta enzima cataliza el rompimiento del  $H_2O_2$  mediante el NADPH. Su actividad se mide por la velocidad de cambio de absorbancia durante la conversión de NADPH a  $NADP^+$  y esta se puede registrar espectrofotométricamente a 300 nm.

- 10 Catalasa.- Esta cuantificación se llevó a cabo por el método de Aebi (1995). Esta enzima cataliza el rompimiento del  $H_2O_2$  y la velocidad de descomposición del agua oxigenada se mide espectrofotométricamente a 240nm.

En la Diabetes Mellitus (tratamiento con Aloxana en forma única) hubo una disminución de un 70 a 75% en la actividad de las tres enzimas estudiadas: superóxido dismutasa, glutación peroxidasa y catalasa.

- 15 La administración conjunta del compuesto de Silimarina y Carbopol y Aloxana mostró un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes pancreáticas ya que esta no fue diferente de los valores control (normales).

- 20 La administración del compuesto de Silimarina y Carbopol veinte días posteriores a la Aloxana revirtió el daño observado en la Diabetes Mellitus en la actividad de las tres enzimas estudiadas e incluso se obtuvieron valores de las actividades enzimáticas superiores a los valores normales (ver tabla).

Actividad enzimática/Tratamiento	Aloxana (20 días posteriores a su administración)	Silimarina administrada 20 días posteriores a la aplicación de la Aloxana
Glutación Peroxidasa $\mu M$ NADPH/min/mg prot	0.016 $\pm$ 0.002	0.052 $\pm$ 0.002
Superóxido Dismutasa U/mg proteína.	4.3 $\pm$ 0.02	46.5 $\pm$ 0.50
Catalasa κ/seg/mg de proteína	0.01 $\pm$ 0.002	0.04 $\pm$ 0.00

## REIVINDICACIONES

Habiendo descrito la invención, se considera como una novedad y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes cláusulas:

5 1.- Composición farmacéutica caracterizada porque contiene Silimarina y Carbopol y un vehículo farmaceuticamente aceptable.

2.-Composición de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizada por contener Silimarina del 3 al 7% y Carbopol del 0.2 al 0.6 %.

10

3.- Composición de acuerdo a la reivindicación 2 donde preferentemente contiene Silimarina en 5% y Carbopol en 0.5%.

15 4.- Composición de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 3 donde la composición farmacéutica puede estar en forma de dosis oral.

20 5.- Composición de acuerdo a la reivindicación 4 donde como forma oral puede ser suspensión, solución oral, emulsión, gel, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda, tableta de liberación inmediata, tableta de liberación controlada, tableta de liberación prolongada, tableta de liberación sostenida.

6.- Composición de acuerdo a la reivindicación 5 donde se prefiere en forma de suspensión oral.

25 7.- El uso de la composición de la reivindicación 1 a base de Silimarina y Carbopol para la fabricación de un medicamento útil en la recuperación del funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas.

30 8.- El uso de acuerdo a la reivindicación 7 donde el funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas provocan la producción de insulina.

9.- Procedimiento para la obtención de la composición de las reivindicaciones 1 a 3 que consta de los pasos:

35 a) Disolución del 0.2 al 0.6 % de Carbopol en agua desionizada sometiéndola a agitación por un período de tiempo de 50 a 90 minutos.

b) Adición de Silimarina en un porcentaje del 3 al 7 a la disolución anterior y se somete a agitación por un período mínimo de una hora hasta lograr una mezcla homogénea.

5 10.- Procedimiento de acuerdo a la reivindicación 9 donde preferentemente se disuelve 0.5% de Carbopol y 5% de Silimarina.

11.- Proceso de acuerdo a la reivindicación 9 donde opcionalmente tiene un paso posterior de solubilización.

10

12.- Proceso de acuerdo a la reivindicación 9 donde opcionalmente tiene un paso posterior de emulsificación.

15

13.- Proceso de acuerdo a la reivindicación 9 donde opcionalmente tiene un proceso de gelificación.

14.- Proceso de acuerdo a la reivindicación 9 donde opcionalmente tiene un proceso de encapsulación.

20

15.- Proceso de acuerdo a la reivindicación 9 donde opcionalmente tiene un proceso de tableteado.

16.- El uso de acuerdo a las reivindicaciones 7 y 8 donde la dosis de administración va de 60 a 220 mg/Kg.

25

17.- Uso de acuerdo a la reivindicaciones 11 a la 15 donde la dosis preferida es de 200 mg/Kg.

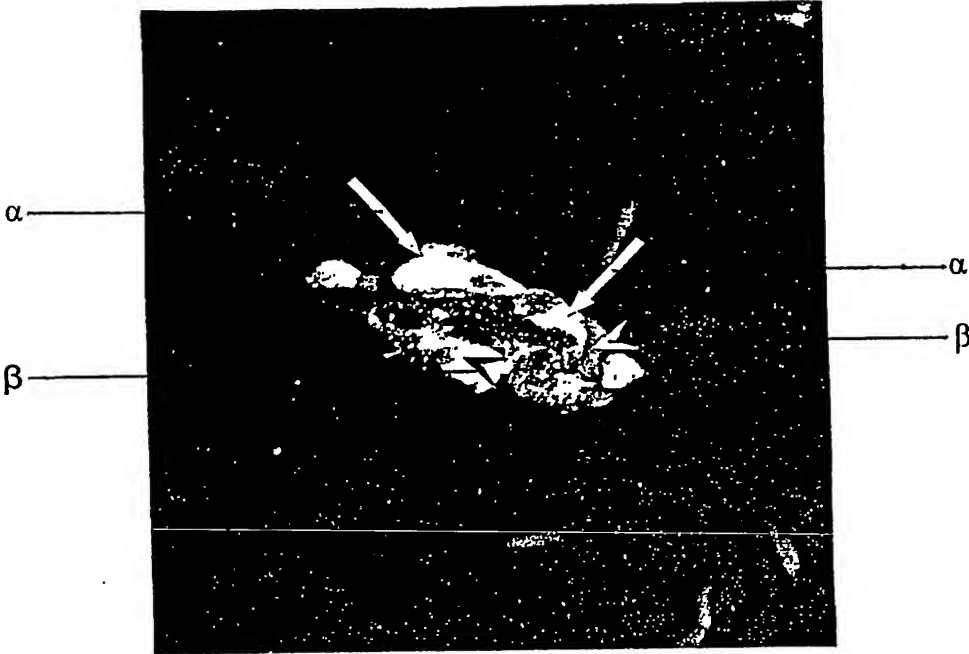


Figura 1

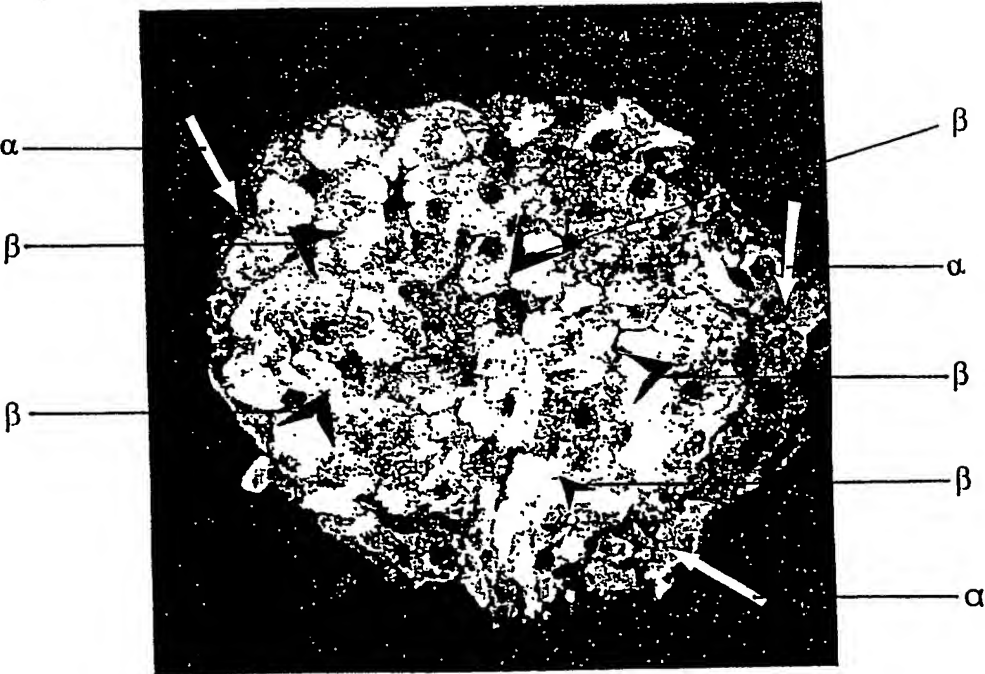


Figura 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/MX 03/00108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K35/78 A61P1/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EP0-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOTO C. P. ET AL: "Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, PART C: PHARMACOLOGY & ENDOCRINOLOGY, vol. 119c, no. 2, 1998, pages 125-129, XP002906015 Elsevier Science Inc. ISSN: 0742-8413 see page 129 the whole document --- -/--	7,8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 2004

Date of mailing of the international search report

18. 05. 2004

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Maquedano Herrero

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/MX 03/00108

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SOTO C. ET AL: "Silymarin regenerates pancreatic tissue damaged by alloxan in hyperglycemic rats."  DIABETES &amp; METABOLISM, 18TH INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION CONGRESS ,PARIS, FRANCE,  vol. 29 (hors serie 2),  24 - 29 August 2003, page 4S157  XP002906016  ISSN: 1262-3636  abstract</p>	7,8
A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>SCHOENFELD VON J ET AL: "SILIBININ, A PLANT EXTRACT WITH ANTIOXIDANT AND MEMBRANE STABILIZING PROPERTIES, PROTECTS EXOCRINE PANCREAS FROM CYCLOSPORINA TOXICITY"  CMLS, CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH,  vol. 53, no. 11/12,  December 1997 (1997-12), pages 917-920,  XP000965040  ISSN: 1420-682X  the whole document</p>	1-17
A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>DATABASE WPI  Section Ch, Week 200205  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class B04, AN 2002-037628  XP002906017  &amp; JP 2001 261571 A (API KK),  26 September 2001 (2001-09-26)  abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/MX 03/00108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2001261571 A	26-09-2001	NONE	



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/MX 03/00108

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION  
CIP 7 A61K35/78 A61P1/18

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	SOTO C. P. ET AL: "Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, PART C: PHARMACOLOGY & ENDOCRINOLOGY, vol. 119c, num. 2, 1998, páginas 125-129, XP002906015 Elsevier Science Inc. ISSN: 0742-8413 see page 129 el documento completo --- -/--	7,8



En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales



Véase el Anexo de la familia de patentes.

### \* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

25 Marzo 2004

Fecha de expedición del presente Informe de búsqueda internacional

18. 05. 2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Sociedad Internacional N°

PCT/MX 03/00108

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
P,X	<p>SOTO C. ET AL: "Silymarin regenerates pancreatic tissue damaged by alloxan in hyperglycemic rats."  DIABETES &amp; METABOLISM, 18TH INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION CONGRESS ,PARIS, FRANCE,  vol. 29 (hors serie 2),  24 - 29 Agosto 2003, página 4S157  XP002906016  ISSN: 1262-3636  resumen</p>	7,8
A	<p>---  SCHOENFELD VON J ET AL: "SILIBININ, A PLANT EXTRACT WITH ANTIOXIDANT AND MEMBRANE STABILIZING PROPERTIES, PROTECTS EXOCRINE PANCREAS FROM CYCLOSPORINA TOXICITY"  CMLS, CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH,  vol. 53, num. 11/12,  Diciembre 1997 (1997-12), páginas 917-920,  XP000965040  ISSN: 1420-682X  el documento completo</p>	1-17
A	<p>---  DATABASE WPI  Section Ch, Week 200205  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class B04, AN 2002-037628  XP002906017  &amp; JP 2001 261571 A (API KK),  26 Septiembre 2001 (2001-09-26)  resumen</p> <p>-----</p>	1-17

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/MX 03/00108

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
JP 2001261571 A	26-09-2001	NINGUNO	